

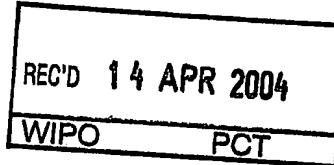
RO/KR 30.03.2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0021476
Application Number



출원년월일 : 2003년 04월 04일
Date of Application APR 04, 2003

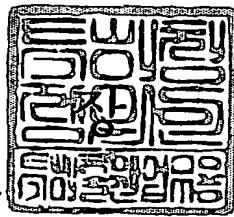
출원인 : (주)셀믹스
Applicant(s) CELLMICS CO., LTD.



2004 년 03 월 30 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 출원인 변경 신고서
 【수신처】 특허청장
 【제출일자】 2003.05.23
 【구명의인(양도인)】
 【성명】 김재홍
 【출원인코드】 4-2003-012681-1
 【사건과의 관계】 출원인
 【신명의인(양수인)】
 【명칭】 (주)셀믹스
 【출원인코드】 1-2001-045610-4
 【대리인】
 【성명】 이희숙
 【대리인코드】 9-2002-000221-5
 【포괄위임등록번호】 2003-021726-6
 【포괄위임등록번호】 2003-017564-3
 【대리인】
 【성명】 김석현
 【대리인코드】 9-1998-000634-1
 【포괄위임등록번호】 2003-021725-9
 【포괄위임등록번호】 2003-017563-6
 【사건의 표시】
 【출원번호】 10-2003-0021476
 【출원일자】 2003.04.04
 【심사청구일자】 2003.04.04
 【발명의 명칭】 페랄고니딘을 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용조성물
 【변경원인】 전부양도
 【취지】 특허법 제38조 제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다. 대리인
 이희숙 (인) 대리인
 김석현 (인)
 【수수료】 13,000 원
 【첨부서류】 1. 양도증_1통 2. 인감증명서[양도인의 것]_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서		
【권리구분】	특허		
【수신처】	특허청장		
【제출일자】	2003.04.04		
【발명의 명칭】	페랄고니딘을 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성을 Composition for preventing or treating allergic disease containing pelargonidin		
【발명의 영문명칭】			
【출원인】			
【성명】	김재홍		
【출원인코드】	4-2003-012681-1		
【대리인】			
【성명】	이희숙		
【대리인코드】	9-2002-000221-5		
【포괄위임등록번호】	2003-021726-6		
【대리인】			
【성명】	김석현		
【대리인코드】	9-1998-000634-1		
【포괄위임등록번호】	2003-021725-9		
【발명자】			
【성명】	김재홍		
【출원인코드】	4-2003-012681-1		
【심사청구】	청구		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이희숙 (인) 대리인 김석현 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	3	면	3,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	4	항	237,000 원

1020 [REDACTED] 1476

출력 일자: 2004/4/7

【합계】	269,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)
【감면후 수수료】	80,700 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 안토시아닌계 화합물인 페랄고니딘을 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 페랄고니딘 또는 페랄고니딘을 함유하는 흑미추출물을 유효성분으로 하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 페랄고니딘 또는 흑미추출물은 염증유발을 억제하므로, 염증유발 과정에서 발생하는 호산구의 기도 내 침착을 저해하여 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 설사 등과 같이 조직 내 염증과 호산구 침착을 동반하는 알레르기성 질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 3

【색인어】

페랄고니딘, 흑미추출물, 염증, 호산구, 알레르기성 질환,

【명세서】**【발명의 명칭】**

페랄고니딘을 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물{Composition for preventing or treating allergic disease containing pelargonidin}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 오브알부민에 의해 천식이 유발된 마우스에 흑미 추출물을 투여한 경우 폐에서 관찰되는 염증억제 효과를 보여주는 사진이다.

A : 정상 마우스

B : 오브알부민에 의해 천식이 유발된 마우스

C : 흑미 추출물 10mg/kg 투여

도 2는 오브알부민에 의해 천식이 유발된 마우스에 안토시아닌계(anthocyanins) 화합물들을 각각 투여한 후, 기도 내에서의 호산구 침착 억제도를 비교하여 나타낸 그래프이다.

1 : 정상 마우스

2 : 오브알부민 투여

3 : 페랄고니딘 0.5mg/kg 투여

4 : 페랄고니딘 1.25mg/kg 투여

5 : 페오니딘 0.5mg/kg 투여

6 : 페오니딘 1.25mg/kg 투여

7 : 델피니딘 0.5mg/kg 투여

8 : 델피니딘 1.25mg/kg 투여

도 3은 오브알부민에 의해 천식이 유발된 마우스에 페랄고니딘(pelargonidin)을 투여한 경우 폐에서 관찰되는 염증억제 효과를 보여주는 사진이다.

A : 정상 마우스

B : 오브알부민에 의해 천식이 유발된 마우스

C : 페랄고니딘 1.25mg/kg 투여

D : 델피니딘 1.25mg/kg 투여

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<15> 본 발명은 알레르기성 질환 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 안토시아닌계 화합물인 페랄고니딘 또는 상기 페랄고니딘을 함유하는 흑미추출물을 유효성분으로 하는 호산구의 조직 내 침착을 저해하고, 알레르기성 염증을 억제할 수 있는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

<16> 알레르기성 질환은 일반적으로 기도 또는 기관지 등의 조직에 알레르기성 염증반응이 진행됨으로써 유발되는 것으로 알려져 있다. 알레르기성 질환이 일어나는 과정을 구체적으로 살펴보면, 먼지, 꽃가루, 곰팡이, 각종 음식물, 약물 등과 같은 알레르겐(항원)이 호흡기, 소화기, 피부를 통해 체내로 들어오면 조직 속의

비만세포(mast cell) 표면에 부착되어 있는 IgE 항체에 결합하게 되고, 이에 따라 비만세포는 히스타민(histamine)이라는 물질을 분비한다. 히스타민은 비점막에서 알레르기성 반응을 일으키는 가장 중요한 화학매체로서, 혈관의 투과성을 증가시켜 비점막의 부종을 일으키고, 감각신경 말단을 자극하여 눈물, 콧물, 가려움증과 같은 다양한 알레르기 초기반응을 유발한다. 이어서 히스타민 이외에 호산구 화학주성 인자(eosinophilic chemotactic factor), 류코트리엔(leukotriene) 등과 같은 화학주성능을 가진 화학매체가 조직 속의 비만세포로부터 분비된다. 이러한 화학주성 물질에 의해 호산구(eosinophile)가 알레르기 발생부위로 이동(주화성; chemotaxis)하게 되어, 조직손상, 염증반응, 과민반응과 같은 알레르기 후기반응을 유발한다.

- <17> 알레르기성 질환에는 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염 등이 있으며, 매연과 같은 공해가 심해지면서 그 수가 늘어나고 있음에도 아직 완전히 치료하는 효율적인 치료제가 없는 실정이다. 또한, 치료가 중단된다면 몇 일 내에 또는 적어도 몇 주 내에 증상이 다시 재발하는 것을 비롯하여 안전성 및 유효성에 있어서도 개선이 필요한 실정이다.
- <18> 현재 개발된 알레르기성 질환 치료제는 증상을 완화시키는 스테로이드 제제가 주류를 이루고 있어 질병의 원인을 근본적으로 제거하지 못할 뿐 아니라 약제들에 의한 부작용도 심각한 상황이다 (Rabe KF, et. al., *Eur Respir J Suppl.*, 34:34s-40s, 2001).
- <19> 또한, 기존의 알레르기성 질환 치료제는 히스타민의 작용을 억제시키는 기능만을 갖고 있는 것이 대부분이기 때문에 염증을 유발하는 주원인인 호산구의 조직 내 침착에 의한 후기반응을 억제시키지 못하여 만성적 알레르기 증상을 일으키기도 하는 문제점이 있었다. 따라서, 이러한 기존 알레르기성 질환 치료제의 결점을 보완할 수 있는 새로운 항알레르기성 약물의 필요성이 증대되고 있다.

<20> 한편, 흑미(*Oryza sativa L.*)는 안토시아닌계(anthocyanins) 화합물이 풍부하게 함유되어 있는 쌀로서, 백미보다 칼슘, 비타민, 니아신 등이 다량 함유되어 있는 건강식품이다. 흑미는 인체의 조절기능을 개선하고 면역기능을 강화시키는 효과가 있다고 알려져 있다. 또한, 각종 질병을 예방하고, 항산화 및 발암 억제효과가 있으며, 특히, 콜레스테롤 억제 효과가 있다고 알려져 있다.

<21> 안토시아닌은 식물의 꽃이나 과실 껍질 등에서 적색 계열의 색깔을 가지는 부분에 많이 존재하는 색소배당체이다. 상기 안토시아닌은 당(糖)의 특정 히드록시기와 각종 알코올, 폐놀, 알데히드 등의 작용기가 에테르형 결합을 하여 이루어진 화합물로서, 델피니딘(delphinidin), 시아니딘(cyanidin), 폐랄고니딘(pelargonidin), 폐오니딘(peonidin), 말비딘(malvidin) 등 200여개 이상의 안토시아닌계 화합물이 알려져 있다. 안토시아닌은 소염작용, 항균, 콜레스테롤 저하작용 등에 관여하며, 천연 항산화제인 토코페롤보다 5-7배의 강한 항산화 효능을 갖고 있다고도 알려져 있다(Tedesco I, et. al., *J. Nutr. Biochem.*, (9):505-511, 2001; Youdim KA, et. al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1523(1):117-122, 2000). 그러나, 안토시아닌계의 각 화합물이 구체적으로 어떤 효과를 갖고 있는지에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

<22> 본 발명자들은 알레르기성 질환의 후기반응인 호산구에 의한 염증반응을 차단시킴으로써 효과적으로 알레르기성 질환을 치료할 수 있는 치료제를 개발하기 위하여 연구를 수행하던 중, 다양한 한방 재료와 천연 물질 중에서, 흑미 추출물이 천식을 효과적으로 억제함을 확인하였다.

또한, 흑미 추출물의 성분들 중 안토시아닌계 화합물, 특히 폐랄고니딘이 호산구의 기도 내 침착을 저해하고, 기도 염증을 효과적으로 억제시키는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<23> 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 조직 내 호산구의 침착과 염증을 억제할 수 있는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

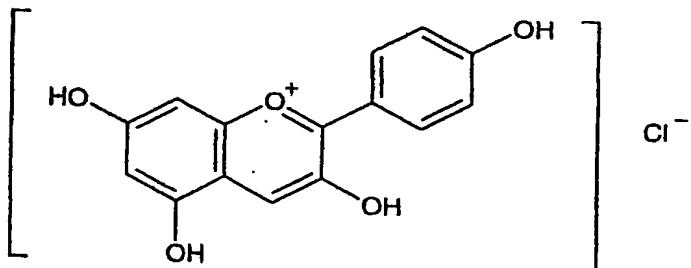
<24> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 흑미추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

<25> 또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 폐랄고니딘

(3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-1-benzopyrylium chloride)을 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

<26> <화학식 1>

<27>



<28> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

- <29> 본 발명에서는 흑미추출물을 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- <30> 또한 본 발명에서는 상기 화학식 1의 페랄고니딘(pelargonidin)을 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- <31> 본 발명에 따른 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 함유되는 흑미추출물은 통상적인 추출법에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나, 알코올 추출법, 물추출법, 유기용매 추출법 및 초임계 추출법 등을 사용할 수 있다. 혹은 바람직하게는, 메탄올, 에탄올 등의 저급 알코올 등의 유기용매를 사용할 수 있다. 분말로 만든 흑미를 상기 용매를 첨가한 후에 여과지에 걸러서 찌거기를 제거하고 나머지 액을 증발 농축기로 교반기로 돌리면서 농축을 시키게 된다. 이때 수거된 증류수는 제거하고 충분히 농축된 액은 동결건조하게 된다. 그리하여 만들어진 분말을 흑미 추출물로서 실험에 사용하게 된다.
- <32> 추출온도는 15 ~ 80°C가 바람직하며, 보다 바람직하게는 25 ~ 60°C 이다. 추출시간은 추출온도에 따라 다르지만, 5시간 내지 24시간, 바람직하게는 7시간 내지 12시간 추출한다. 또한, 추출시 교반기(shaker)로 교반할 경우에 더욱 추출효율을 증대시킬 수 있다.
- <33> 본 발명의 일 실시예에서는 흑미에 에탄올을 가하고 35°C로 7시간 동안 추출한 다음 추출액을 증발 건조시켜 흑미추출물 분말을 수득하였다(제조예 1 참조).
- <34> 본 발명에 따른 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 함유되는 상기 화학식 1의 페랄고니딘은 상업적으로 구입하여 사용하거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조할 수 있다(Nakajima N, et. al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61(11):1926-1928, 1997). 바람직 하게는, 본 발명에 따른 페랄고니딘은 천연으로부터 분리 정제될 수 있다. 가장

바람직하게는, 흑미로부터 분리 정제될 수 있다. 흑미로부터 폐랄고니딘을 분리 정제하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 바람직하게는 흑미의 유효성분을 유기 용매 추출한 후 이를 크로마토그래피로 분리 정제함으로써 목적으로 하는 순수한 화합물을 수득할 수 있다.

<35> 상기 폐랄고니딘(pelargonidin)은 아직까지 정확한 작용기전은 밝혀지고 있지는 않지만, 강력한 항산화제 역할을 하리라 여겨지고 있는 물질이다. 특히, 독성이 낮고 흡수가 뛰어난 장점을 갖고 있어 인체에 투여 가능한 질병 치료제로서 유용하리라 여겨지고 있지만(Ross JA, et al., *Annu Rev Nutr.*, 2002; 22:19-34. Review), 아직까지 항산화제로서의 역할 이외의 용도에 대해서는 알려진 바가 없다.

<36> 본 발명의 일 실시예에서는 오브알부민으로 감작되어 천식이 유발된 마우스에서 흑미 추출물이 알레르기성 질환의 일반적 증상인 염증을 억제하는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 천식이 유발된 마우스에 흑미 추출물을 투여한 경우, 흑미 추출물이 폐에서 염증을 현저히 억제함을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

<37> 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 흑미 추출물의 주요 성분인 안토시아닌계 화합물 중 어떤 화합물이 알레르기성 질환의 일반적 증상인 호산구의 기도 내 침착과 염증을 억제하는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 천식이 유발된 마우스에 주요 안토시아닌계 화합물인 폐랄고니딘, 벨피니딘, 폐오니딘을 투여한 경우, 폐랄고닌 만이 염증유발 세포인 호산구(eosinophile)의 기도 내 침착을 저해하고 폐에서 염증을 억제하는 효과가 탁월함을 확인할 수 있었다(도 2 및 도 3 참조). 즉, 대표적 안토시아닌계 화합물 중에서 벨피니딘은 전혀 효과가 없으며, 폐오니딘은 효과가 있었으나 미약하였고, 폐랄고니딘 만이 호산구의 기도 내 침착과

폐에서의 염증을 현저히 억제함을 확인하였다. 따라서, 폐랄고니딘이 알레르기성 질환의 치료 또는 예방용 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

<38> 따라서, 본 발명에 따른 흑미추출물 또는 폐랄고니딘을 함유하는 조성물은 포유동물, 특히 사람에 있어서 기관지천식, 고초열, 혈관운동신경성 비염, 비후성 비염, 알레르기성 기관지염, 일과성 폐침윤, 알레르기성 위염, 알레르기성 설사, 알레르기성 구내염, 장성 자반병, 결절성 동맥주 위염, 폐색성 동맥내막염, 협심증, 심내막염, 두드러기, 혈관신경성 부종, 결절성 홍반, 자반병, 아토피성 피부염, 플릭텐, 교감성 안염, 알레르기성 결막염 및 알레르기성 각막염으로 이루어진 군에서 선택되는 알레르기성 질환을 예방하거나 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<39> 본 발명에서 '유효량'이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 화합물 또는 추출물의 양을 말한다. 바람직하게는 흑미추출물의 경우 통상적인 1일 투여량은 1 내지 100 mg/kg, 바람직하게는 10 내지 30 mg/kg 의 범위이며, 상기 화학식 1의 폐랄고니딘의 경우 통상적인 1일 투여량은 0.1 내지 10 mg/kg, 바람직하게는 0.5 내지 2 mg/kg 의 범위이다. 상기 화합물과 추출물은 바람직한 투여량 범위 내에서 1회 또는 수회로 분할 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명에 따른 흑미추출물 또는 폐랄고니딘의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다.

<40> 포유동물, 특히 사람에게 본 발명 화합물의 유효량을 제공하기 위한 적합한 투여 경로를 이용 할 수 있다. 예를 들면, 경구, 직장, 국소, 비경구, 안내, 폐내 및 비강내 투여 등을 이용할

수 있다. 투여 형태는 정제, 트로키제, 분산제, 혼탁제, 액제, 캡슐제, 크림제, 연고제 및 에어로졸 등이 포함된다.

- <41> 본 발명의 조성물은 활성 성분으로서 화학식 1의 폐랄고니딘 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염을 포함하고, 또한 약제학적으로 허용되는 담체 및 임의로 기타의 치료용 성분을 함유할 수도 있다. 용어 '약제학적으로 허용되는 염'은 약제학적으로 허용되는 무독성 염기 또는 산(여기에는 무기 염기 또는 무기 산, 및 유기 염기 또는 유기산이 포함된다)으로부터 제조된 염을 의미한다.
- <42> 조성물에는 경구, 직장, 국소, 피하, 근육내 및 정맥내를 포함하는 비경구, 안내(눈으로), 폐내(비강 흡입법 또는 구강 흡입법) 또는 비강내로 투여하기에 적합한 조성물이 포함되며, 어떠한 경우라도 가장 적합한 경로는 치료할 질환의 특성 및 종종도, 그리고 활성 성분의 특성에 따라 다를 것이다. 조성물은 편리하게 단위 투여 형태로 존재할 수 있고, 약학 분야에서 잘 공지된 방법 중 하나에 의해 제조될 수 있다.
- <43> 흡입법으로 투여하는 경우, 본 발명의 화합물은 가압된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 분무제 형태로 편리하게 운반된다. 또한, 본 발명의 화합물은 제형화될 수 있는 분말로서 운반될 수 있고, 분말 조성물은 통기 분말 흡입 장치를 사용하여 흡입시킬 수 있다. 흡입을 위한 바람직한 운반 시스템은 계량 투여량 흡입(MDI) 에어로졸이고, 이는 탄화불소 또는 탄화수소와 같은 적합한 추진제 중 하나와 흑미추출물 또는 화학식 1의 화합물 용액 또는 혼탁액으로 제형화될 수 있다.

- <44> 흑미추출물 또는 페랄고니딘의 적합한 국소 투여용 제형물에는 경피용 제제, 에어로졸, 크림제, 연고제, 로션제 및 살포제가 포함된다.
- <45> 실제로 사용할 경우, 활성 성분으로서의 흑미추출물 또는 페랄고니딘을 통상의 약제학적 혼합기술에 따라 약제학적 담체와 함께 혼합물로 잘 혼합시킬 수 있다. 담체는 목적하는 투여 형태(예를 들면, 경구 또는 정맥내 투여를 포함하는 비경구 투여)에 따라 다양할 수 있다. 경구용 투여 형태의 조성물을 제조할 때, 예를 들면, 혼탁제, 엘리셔제 및 액제와 같은 액체 경구용 제제의 경우에, 통상의 약제학적 매질, 예를 들어, 물, 글리콜, 오일, 알코올, 향미제, 방부제 및 착색제 등의 임의의 것을 사용할 수 있거나, 예를 들면, 산제, 캡슐제 및 정제와 같은 고체 경구용 제제의 경우에, 전분, 당, 미정질 셀루로오즈, 희석제, 과립화제, 윤활제, 결합제 및 봉해제와 같은 담체를 사용할 수 있으며, 고체 경구용 제제가 액체 제제보다 바람직하다. 정제 및 캡슐제는 이들의 투여 용이성 때문에 가장 이로운 경구 투여 단위 형태이며, 이때 고체 약제학적 담체가 명백하게 사용된다. 경우에 따라, 정제는 표준 수성 또는 비수성 기술에 의해 피복시킬 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

<46> 본 발명에서 흑미추출물 또는 폐랄고닌딘을 함유하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에는 알레르기성 질환의 약학적 조성물은 물론 알레르기성 질환의 예방을 위한 건강식품 조성물도 포함된다. 상기한 바와 같이, 흑미추출물 또는 폐랄고니딘은 염증을 억제하고, 염증 유발 세포인 호산구의 기도 내 침착을 저해하고 폐에서 염증을 억제하는 효과가 있으므로 이를 함유하는 건강식품 조성물은 알레르기성 질환을 예방하거나, 알레르기성 질환 치료제의 보조 제로서 효과적으로 사용될 수 있다.

<47> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<48> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<49> <실시 예 1>

<50> 흑미 추출물의 제조

<51> 흑미를 분말로 만든 후, 상기 흑미 분말에 100% 에틸알코올을 가하여 35℃에서 7시간 동안 추출하였다. 상기에서 얻은 추출액을 증발시키고 남는 물질을 동결건조하여 분말화하여 흑미 추출물을 제조하였다.

<52> <실시예 2>

<53> 흑미 추출물에 의한 천식 억제 효과 검증

- <54> 본 실시예에서는 흑미 추출물이 천식 유발 마우스에서 발생한 염증을 억제함으로써 결과적으로 알레르기성 천식을 억제할 수 있는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다.
- <55> 우선, 천식이 유발된 동물모델을 만들기 위하여, 10주령된 암컷 마우스 20마리(C57BL/6, 다물 사이언스, 대전)에 오브알부민 용액(ovalbumin 200 μ g + alumina gel 1000 μ g을 생리 식염수에 녹임) 200 μ l를 복강 내로 투여하였다. 2주 후, 오브알부민 용액(2%, w/v) 200 μ l씩을 각 마우스에 분무하여 감작시켰다. 21일, 22일, 23일째에 다시 1% 오브알부민 용액 200 μ l씩을 분무하고, 25일째에 10% 오브알부민을 분무하여 감작시켰다.
- <56> 상기 10% 오브알부민으로 감작되어 천식이 유발된 마우스들을 두 군으로 나누어 한 군은 아무 것도 처리하지 않은 음성 대조군으로 사용하였으며, 또 다른 한 군은 흑미 추출물 10mg/kg을 투여하였다. 흑미 추출물의 동물주입은 복강주사로 실시하였으며, 오브알부민 처리시작 후 24일, 25일째에 두 번씩 주입하였다.
- <57> 흑미 추출물 처리 48 시간째에, 상기 마우스들을 에테르(ether)를 이용하여 희생시켰고, 각 마우스의 폐에서 관찰되는 세포들의 염증변화를 측정하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 정상 마우스(도 1의 A)와 비교할 때 천식이 유발된 마우스들의 경우 천식 유발 항원인 오브알부민에 의해 폐의 기관지내 염증이 크게 증가하였지만(도 1의 B 참조), 이러한 기관지 염증이 흑미 추출물의 투여에 의해 크게 감소되었음을 확인할 수 있었다(도 1의 C 참조). 즉, 흑미 추출물이 천식을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- <58> <실시 예 3>
- <59> 흑미 추출물 중 안토시아닌계 화합물이 호산구의 기도 내 침착에 미치는 영향

- <60> 상기 천식 억제 효과가 있는 흑미 추출물의 주요 성분은 안토시아닌계 화합물이다. 본 실시 예에서는 이러한 흑미 추출물의 주요 활성성분인 안토시아닌계 화합물이 천식 억제 작용을 하는지, 또한, 안토시아닌계 화합물 중 구체적으로 어떤 종류의 화합물이 천식을 억제하는지 확인하는 실험을 수행하였다.
- <61> 상기 실시예 2의 방법과 동일하게 천식을 유발시킨 마우스를 네 군으로 나누어 한 군은 음성 대조군으로 사용하였고, 나머지 세 개의 군은 각각 주요한 안토시아닌계 화합물인 페오니딘(peonidin), 델피니딘(delphinidin), 페랄고니딘(pelargonidin)을 0.5mg/kg, 1.25mg/kg을 각각 투여하여 시험군으로 하였다.
- <62> 처리 2일 째에, 각각의 마우스들을 에테르로 희생시킨 후, 기관지(trachea)에 미세관을 연결하였고, 이 관을 통하여 PBS(phosphate-buffered saline, 0.8ml)를 주입하고 이를 다시 회수하는 과정을 2회 반복하였다. 이렇게 하여 얻어진 기관지 폐포 세척액(BALF; Bronchoalveolar lavage fluid)을 원심분리하여 기도 내강(airway lumen)내에 존재하는 세포와 이 세포들 및 폐에서 분비된 여러 단백질들을 분리하였다.
- <63> 분리된 세포는 다시 시토스핀(cytospin)을 이용하여 슬라이드(slide)에 고정시킨 후, 디프-퀵 염색용액(Diff-Quick staining solution)을 이용하여 염색하였고, 칼제이스 현미경(Carzeiss 현미경, model: AXIOVERT 25-CEL)에 부착된 디지털 카메라(digital camera)로 사진을 찍었다. 각 샘플당 5곳의 랜덤 지역(random region)을 카운팅(counting)하여 각 세포의 호산구(eosinophil)의 비를 구하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<64> 도 2에 나타난 바와 같이, 오브알부민에 노출된 마우스의 기도에서는 호산구의 비가 58% 정도로 높았으나, 안토시아닌계 화합물인 페랄고니딘, 페오니딘, 델피니딘을 투여한 경우 호산구의 기도 내 침착이 억제되었음을 확인할 수 있었다. 특히, 페랄고니딘을 각각 0.5mg/kg, 1.25mg/kg을 투여한 경우, 기도 내 호산구의 비가 각각 30%, 20%로 낮아져, 호산구의 기도 내 침착이 보다 높게 억제되었음을 확인할 수 있었다. 즉, 안토시아닌계 화합물 중 페랄고니딘이 기도 내 호산구 침착을 보다 효과적으로 저해할 수 있음을 확인할 수 있었다.

<65> <실시예 4>

<66> 페랄고니딘(pelargonidin)이 천식 염증 억제에 미치는 영향

<67> 본 실시예에서는 상기 기도 내 호산구 침착을 높게 저해하였던 페랄고니딘이 폐 내의 염증을 효과적으로 억제하여 결과적으로 알레르기성 천식을 억제할 수 있는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다.

<68> 상기 실시예 2에서와 같이 10% 오브알부민으로 감작되어 천식이 유발된 마우스들을 세 군으로 나누어 한 군은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군으로 사용하였으며, 한 군은 양성 대조군으로 주요 안토시아닌계 화합물인 델피니딘을, 또 다른 한 군은 페랄고니딘을 각각 투여하였다. 각 화합물의 동물주입은 복강주사로 실시하였으며, 오브알부민 처리시작 후 24일, 25일째에 두 번씩 주입하였다.

<69> 각 화합물 처리 48 시간째에, 상기 마우스들을 에테르(ether)를 이용하여 희생시켰고, 각 마우스의 폐에서 관찰되는 세포들의 염증변화를 측정하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와

같이, 정상 마우스(도 3의 A)와 비교할 때 천식이 유발된 마우스들의 경우 천식 유발 항원인 오브알브민에 의해 폐의 기관지 내 염증이 크게 증가하였지만(도 3의 B 참조), 이러한 기관지 염증이 폐랄고니딘의 투여에 의해 크게 감소되었을 확인할 수 있었다(도 3의 C 참조). 이러한 억제효과는 폐랄고니딘을 1.25mg/kg을 투여한 군에서 현저히 나타났으며, 0.5mg/kg을 투여한 군에서도 현저한 효과를 보여주었다(결과 미도시). 반면, 다른 안토시아닌계 화합물인 델피니딘을 처리한 경우(1.25mg/kg)에는 기관지 염증이 억제되지 않음을 확인할 수 있었다(도 3의 D 참조).

【발명의 효과】

<70> 상기 기재한 바와 같이, 흑미추출물 또는 흑미추출물에 함유되어 있는 폐랄고니딘은 염증유발을 억제하고, 염증유발 과정에서 발생하는 호산구의 기도 내 침착을 저해하였다. 따라서, 흑미추출물 또는 폐랄고니딘을 함유하는 본 발명의 조성물은 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 설사 등과 같이 염증과 호산구 침착을 동반하는 알레르기성 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

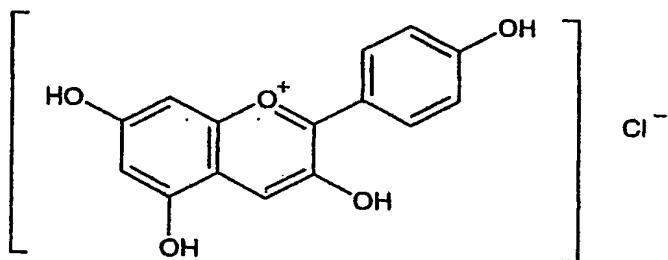
【청구항 1】

흑미추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물.

【청구항 2】

하기 화학식 1의 페랄고니딘(pelargonidin)을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물.

<화학식 1>



【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 알레르기성 질환은 기관지천식, 고초열, 혈관운동신경성 비염, 비후성 비염, 알레르기성 기관지염, 일파성 폐침윤, 알레르기성 위염, 알레르기성 설사, 알레르기성 구내염, 장성 자반병, 결절성 동맥주 위염, 폐색성 동맥내막염, 협심증, 심내막염, 두드러기, 혈관신경성 부종, 결절성 홍반, 자반병, 아토피성 피부염, 플릭텐, 교감성 안염, 알레르기성 결막염 및 알레르기성 각막염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 알레르기성

10201476

출력 일자: 2004/4/7

질환 예방 또는 치료용 조성물.

【청구항 4】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 건강식품 조성물을 포함하는 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물.

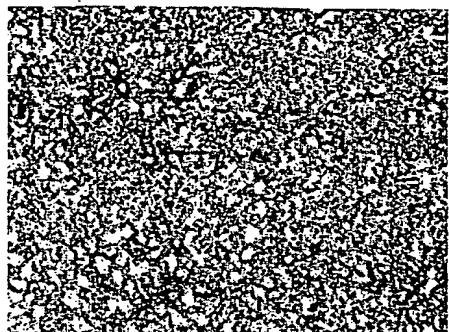
1020 01476

출력 일자: 2004/4/7

【도면】

【도 1】

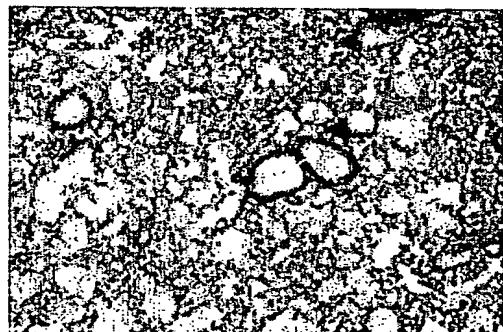
A



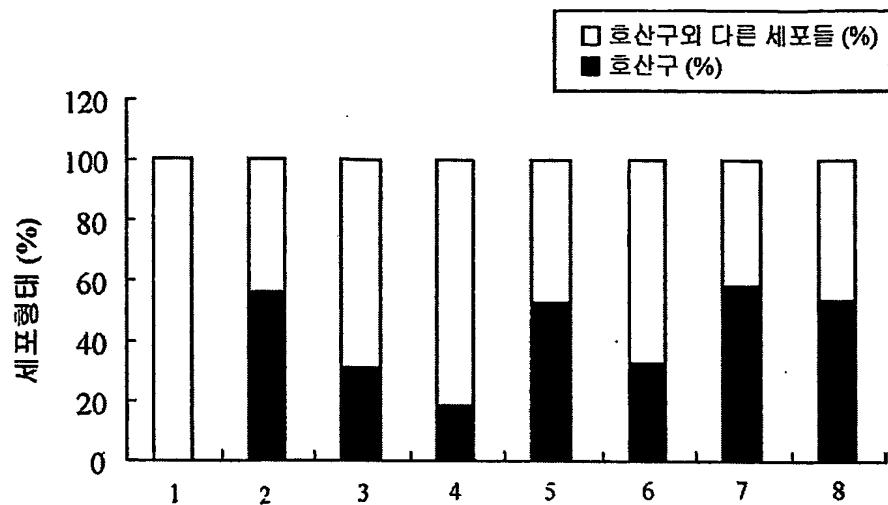
B



C



【도 2】



1020 21476

출력 일자: 2004/4/7

【도 3】

A



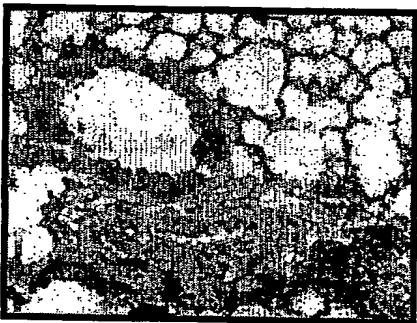
B



C



D



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**